

OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS
ESPAÑA

⑪ Número de publicación: **2 150 670**
⑫ Int. Cl.⁷: C07C 323/52
A23K 1/16

⑫

TRADUCCION DE PATENTE EUROPEA

T3

⑬ Número de solicitud europea: **96914681.0**
⑬ Fecha de presentación : **17.05.1996**
⑭ Número de publicación de la solicitud: **0 840 723**
⑭ Fecha de publicación de la solicitud: **13.05.1998**

⑮ Título: **Sales de ácidos alfa-hidroxi carboxílicos alifáticos y su preparación.**

⑯ Prioridad: **19.05.1995 US 444760**

⑰ Titular/es: **ZINPRO CORPORATION**
Suite 300, 6500 City West Parkway
Eden Prairie, MN 55344, US

⑯ Fecha de la publicación de la mención BOPI:
01.12.2000

⑰ Inventor/es: **Abdel-Monem, Mahmoud M.**

⑯ Fecha de la publicación del folleto de patente:
01.12.2000

⑰ Agente: **Isem Jara, Jaime**

ES 2 150 670 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (artº 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28038 Madrid

DESCRIPCION

Sales de ácidos alfa-hidroxi carboxílicos alifáticos y su preparación.

Antecedentes y trasfondo de la invención

La importancia de un apropiado suministro de metionina a la dieta de ambos animales y humanos, se ha venido reportando desde hace mucho tiempo en la bibliografía especialidad. La metionina, es un aminoácido esencial que se necesita en la construcción de proteínas en su conjunto. Durante un cierto tiempo se ha conocido el hecho de las tomas diarias adecuadas de metionina para cerdos, ganado vacuno y aves, y la importancia que ello supone. Un nivel adecuado de metionina en las dietas de los cerdos, ganado vacuno y aves, ha mostrado su importancia para un crecimiento sano de los animales. Las dietas animales, se suplementan a menudo con DL-metionina para asegurar el contenido o aporte adecuado de aminoácidos de azufre.

El análogo DL-alfa hidroxi de la metionina (MHA) se ha utilizado como sustituto para la DL-metionina, particularmente, en dietas para ganado. La eficacia del análogo alfa-hidroxi y su sal de calcio, fueron comparadas con la de la DL-metionina en un bioensayo de polluelos. Estos estudios, indicaron que la sal de Ca del análogo alfa-hidroxi, es superior al ácido libre y tiene una eficacia aproximadamente equivalente a la DL-metionina.

La síntesis de ácido DL-alfa-hidroxi-gamma-mercaptop butírico (el análogo alfa-hidroxi de la metionina) y su sal de calcio, fueron descritas por Blake y colegas en las patentes estadounidenses U.S. 2.745.745 y U.S. 2.938.053, publicadas respectivamente el 15 de Mayo de 1956 y el 24 de Mayo de 1960. La sal de zinc del análogo alfa-hidroxi, se dio también a conocer en la bibliografía especializada. Las sales de calcio y de zinc dadas a conocer, anteriormente mencionadas, son las sales de los diácidos en los cuales el ácido alfa-hidroxi (alfa-hidroxiácido), se neutralizan con un ión de los cationes divalentes de zinc y de calcio. Estas sales, son muy escasamente solubles en el agua. La baja solubilidad en el agua de las sales, hace decrecer probablemente la bioasequibilidad de estos productos como suplementos para piensos y, un compuesto soluble en el agua, tiene que ser con toda probabilidad más bioasequible, es decir, más aprovechable desde el punto de vista biológico.

La solicitud de patente europea EP - A - 556 498 y la patente estadounidense U.S. 4 067 994, dan a conocer sales de complejos de metionina y de metales de transición 1:1, que contienen un catión de un mineral de traza, divalente o trivalente.

En concordancia con lo anteriormente expuesto, es un objeto de la presente invención el proporcionar nuevos compuestos de análogos DL-alfa hidroxi de metionina, en donde, los análogos DL-alfa hidroxi de metionina, se encuentren en una forma que pueda ser fácilmente absorbida después de la ingestión por parte de animales y fácil y rápidamente distribuida utilizada con objeto de proporcionar unos niveles adecuados de metionina para la apropiada salud, crecimiento y dieta equilibrada de los animales.

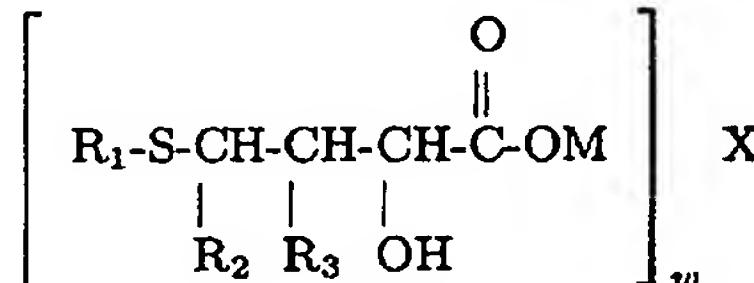
Otro objeto de esta invención, es el proporcionar un procedimiento para fabricar nuevos compuestos de análogos DL-alfa hidroxi de metionina, que sea fácil de realizar y que pueda utilizarse de una forma económica en plantas de producción a gran escala, para preparar los nuevos compuestos de la presente invención a granel, para su fácil utilización en grandes cantidades para suplementar las dietas de los animales y de los humanos. El procedimiento para el cumplimiento de estos y de otros objetos de la presente invención, se evidenciará mediante la descripción de ésta que se facilita a continuación.

Resumen de la invención

La presente invención, se refiere a la preparación de nuevas sales de ácidos alfa-hidroxi carboxílicos alifáticos y procedimientos para su preparación. Estas nuevas sales, son las sales de aniones mezcladas con un catión divalente o trivalente, que sea un elemento de traza (oligoelemento) esencial. La preparación de estas sales mixtas, requiere especiales precauciones para impedir la formación de productos diácidos, que son escasamente solubles en agua. Las sales de aniones mixtas, se caracterizan por una alta solubilidad en el agua y una bioasequibilidad incrementada. Cuando éstas se sintetizan de una forma apropiada, estas sales de metionina, funcionan como una fuente fácilmente asequible de metionina para la suplementación de las dietas.

Descripción detallada de la invención

Es importante el tomar debida nota del hecho de que, a los compuestos correspondientes a la presente invención, se les hace aquí referencia como "complejos de oligoelementos minerales del ácido hidroxílico de la metionina (MHA) - ("MHA", del inglés : Methionine Hydroxy Acid trace mineral complexes). Estas sales, deben distinguirse de una forma cuidadosa de las sales convencionales tales como, por ejemplo, sulfato de zinc y sulfato de magnesio, que contienen únicamente una atracción electrostática entre el catión y el anión. Las sales complejas de la presente invención, difieren de las sales convencionales en lo referente al hecho de que, mientras éstas últimas tienen una atracción electrostática entre el catión y el anión, en las primeras, existe también un enlace covalente formando por el metal y la porción hidroxi del ácido hidroxílico MHA. Las sales complejas del ácido hidroxílico de la metionina y metal, tienen la fórmula general:



en donde,

R₁, es metilo o etilo,

R₂, es hidrógeno, metilo o etilo,

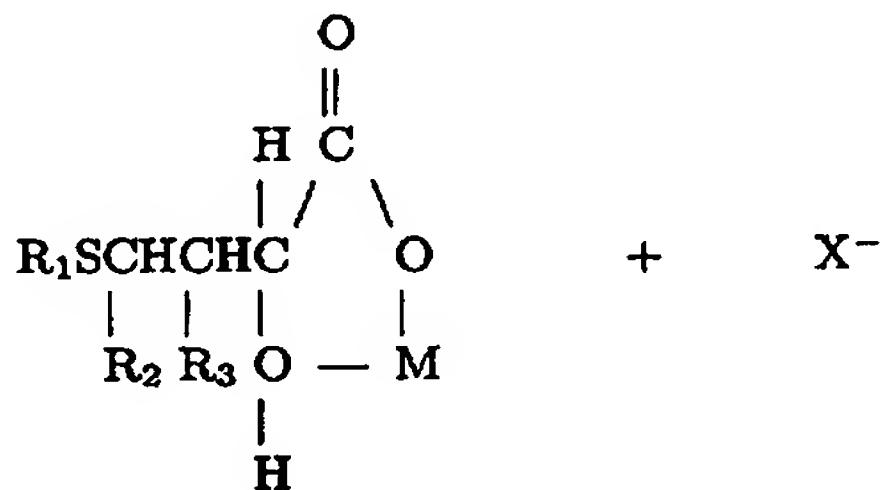
R₃, es hidrógeno o metilo,

M, es un catión de un mineral oligoelemento, divalente o trivalente,

X es un anión y

W, es un número entero para equilibrar la carga aniónica de X.

El catión de estas sales complejas, se representa como un complejo de oligoelemento mineral y un análogo alfa-hidroxi de la metionina 1:1. Estéricamente, la porción se puede representar de la siguiente forma:



Tal y como se puede ver y se desprende de esta fórmula, la formación de anillo de cinco miembros, existe allí en donde el catión del mineral de traza u oligoelemento, está complejado mediante un enlace covalente con una porción hidroxi, y la atracción electrostática con la porción del ácido carboxílico del análogo alfa hidroxi de metionina. Adicionalmente a ello, el complejo se encuentra formado por un valor de relación 1:1 del análogo las moléculas alfa-hidroxi de metionina y aniones de oligoelemento mineral, convirtiéndose cada anión de oligoelemento mineral en complejado con una molécula de MHA. La preparación de estas sales mixtas, requiere unas especiales precauciones con objeto de evitar la formación de los productos diácidos que sean escasamente solubles en el agua. Las sales de aniones mixtas, se caracterizan por una alta solubilidad en el agua y una bioasequibilidad incrementada, proporcionando de esta forma una utilización efectiva del análogo de metionina.

En la fórmula anteriormente descrita, más arriba, en este documento, X representa el anión. El anión, puede ser un anión inorgánico, un anión orgánico, un anión monovalente, un anión divalente, o un anión polivalente. Sin embargo, con objeto de tener moléculas de la sal electrostáticamente equilibradas, w es un número entero total para equilibrar la carga aniónica del anión X.

De una forma preferente, la fuente del anión, X, es un ácido inorgánico. Los aniones inorgánicos apropiados, pueden encontrarse en la familia de los ácidos inorgánicos, los sulfatos y los fosfatos. De una forma preferente, allí en donde el anión es un anión inorgánico, éste se selecciona de entre el grupo consistente en aniones monovalentes, tales como los haluros, hidrógenosulfato, y dihidrógenofosfato. Se prefiere la utilización de aniones monovalentes seleccionados de entre el grupo arriba mencionado, debido al hecho de su solubilidad incrementada y debido al hecho de las fuentes fácilmente asequibles de aniones inorgánicos comunes, tales como los haluros,

hidrógeno sulfato y dihidrógenofosfato. De una forma mayormente preferible, el anión se selecciona de entre el grupo consistente en cloruro e hidrógenosulfato o sulfato ácido, utilizándose aquí, estos dos últimos términos, de una forma intercambiable.

Tal y como se ha mencionado brevemente, más arriba, en este documento, el anión puede también ser una porción de anión orgánico, derivado de un ácido orgánico. Éste puede derivarse de ácidos carboxílicos alifáticos simples, tanto ácidos carboxílicos monobásicos como ácidos carboxílicos dibásicos. Por ejemplo, el anión, puede ser acetato o propianato o, cuando el ácido es un ácido dibásico, succinato o adipato. Adicionalmente a ello, la fuente de ácido, puede ser la de ácidos alifáticos sustituidos, tanto monobásicos como dibásicos, tales como por ejemplo el ácido cloroacético. La fuente de ácido del anión, puede ser también la de ácidos aromáticos tales como, por ejemplo, el ácido benzoico. La fuente, puede ser también la de ácidos aralquílicos, tanto sustituidos como insustituidos. Allí en donde se utilicen fuentes de ácidos orgánicos como fuentes del anión para las sales de la presente invención, es preferible que la fuente sea un ácido carboxílico monobásico y que, el ácido, sea o bien ácido propiónico o ácido benzoico.

En la fórmula anteriormente descrita, más arriba, en este documento, M representa un catión covalente o trivalente de oligoelemento mineral. Los oligoelementos minerales preferibles, incluyen al zinc, cobre, manganeso, hierro y cromo.

Una importante característica de las sales complejas 1:1, que tienen una análogo alfa hidroxi de metionina y complejos de oligoelementos minerales como un catión y asociadas con aniones apropiados, reside en el hecho de que, las sales formadas, son superiores a la anteriormente conocidas sales de diácidos alfa hidroxi, debido a la solubilidad incrementada en el agua para bioasequibilidades potencialmente incrementadas en animales.

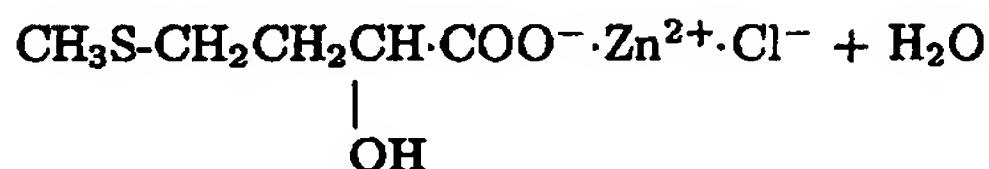
Los ejemplos que se facilitan a continuación, se proporcionan para ilustrar adicionalmente el producto y procedimientos correspondientes a la presente invención. Dichos ejemplos, no intentan en absoluto limitar en modo alguno el alcance de la invención.

Ejemplo 1

Cloruro del ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptopbutírico y zinc (cloruro de alfa hidroxi metionina y zinc)

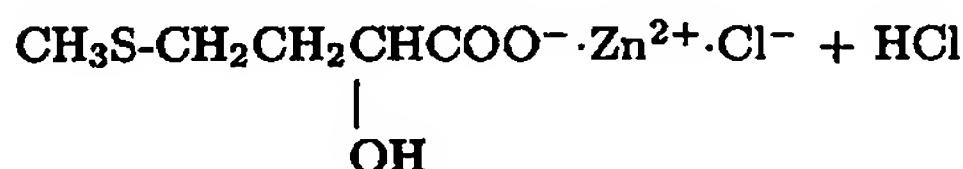
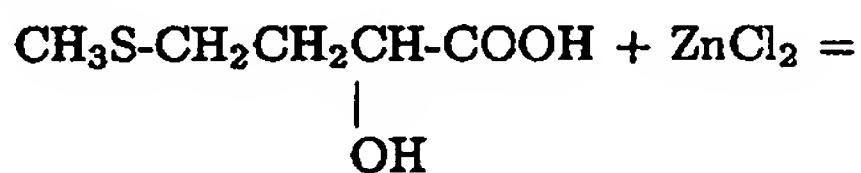
Procedimiento 1

Un equivalente molar del ácido hidroxílico, se añadió a un equivalente molar de óxido de zinc. Se añadió lentamente una solución de ácido clorhídrico, procediendo a calentar y mezclar hasta que el óxido de zinc se hubiese disuelto completamente. Únicamente se requirió un equivalente molar de ácido clorhídrico. Se necesitaron adicionalmente dos décimas partes de un equivalente molar (20 por ciento), para ajustar el pH con objeto de asegurar la estabilidad de la sal mixta en solución.



Procedimiento 2

Un equivalente molar del hidroxiácido, se mezcló con una solución de un equivalente molar de cloruro de zinc. Se formó una solución clara. La solución, se concentró bajo presión reducida y, el producto de destilación, se recogió cuidadosamente. Se procedió a valorar el producto de destilación mediante una solución standard de hidróxido potásico utilizando fenolftaleína como indicador. Se recuperaron seis décimas de un equivalente molar de ácido clorhídrico (60 por ciento del valor teórico). La destilación adicional, indicó que, se obtuvo ácido clorhídrico adicional lentamente.



Procedimiento 3

Se procedió a medir el pH de soluciones 1,0, 0,1 y 0,01 M del ácido alfa-hidroxi y se procedió a medir y listar una mezcla de alfa-hidroxi ácido y cloruro de zinc en la siguiente tabla:

	pH a 25°C		
	1,0 M	0,1 M	0,01 M
Alfa-hidroxiácido	2,21	2,62	3,05
Mezcla de ácido alfa hidroxi y cloruro de zinc	1,19	2,08	3,04

El ácido alfa-hidroxi, es un ácido parcialmente disociado. Una dilución de 10 veces su solución, da como resultado un cambio de aproximadamente 0,5 unidades pH. Sin embargo, cuando el alfa-hidroxiácido es mezcla con cloruro de zinc, la sal mixta se forma adicionalmente a un equivalente molar de ácido clorhídrico. El ácido clorhídrico liberado, es un ácido fuerte (completamente disociado). Una dilución de 10 veces de una solución de ácido fuerte, se espera que de como resultado un cambio de aproximadamente 1,0 unidades en el pH. Los resultados recopilados en la tabla, confirman esta conclusión.

Ejemplo 2

Hidrógenosulfato del ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptopbutírico y cobre y cloruro de cobre

Procedimiento 1

Una solución de un equivalente molar del alfa-hidroxiácido, se añadió mediante goteo a una solución de un equivalente molar de sulfato de cobre. El color azul intenso de sulfato de cobre, cambió lentamente a un color verdoso y, después,

a un color verde intenso. El cambio de color de la solución de cobre, indica la formación del complejo entre el cation Cu++ y el ácido hidroxiácido.

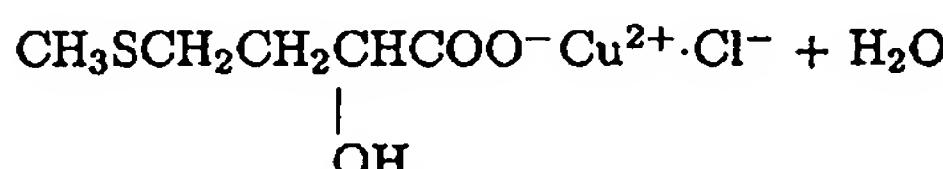
Procedimiento 2

Un equivalente molar del ácido alfa-hidroxi, se mezcló con una solución de un equivalente molar de sulfato de cobre.

La solución, se mezcló con una portador soluble y se secó utilizando un secador en forma de atomizador (proyección pulverizada). Se extrajo una muestra del producto con metanol absoluto. El metanol, eliminó todo el producto coloreado en color verde y dejó detrás al portador inerte. El extracto de metanol, se evaporó hasta secado para proporcionar un polvo homogéneo de color verde. El residuo, se evaporó en metanol, se filtró y, el producto de la filtración, se evaporó hasta secado. El producto homogéneo de color verde, se recogió y se analizó.

Procedimiento 3

Un equivalente molar de óxido de cobre, se añadió a una solución de un equivalente molar de ácido alfa-hidroxi en agua. El óxido de cobre, era únicamente parcialmente soluble. Se añadió una solución de ácido clorhídrico. Únicamente se requirió un equivalente molar de ácido clorhídrico para la solubilización completa del óxido de cobre. Se requirió ácido clorhídrico adicional (dos décimos de un equivalente molar ó 20 por ciento), para ajustar el pH con objeto de asegurar la estabilidad de la sal mixta formada.

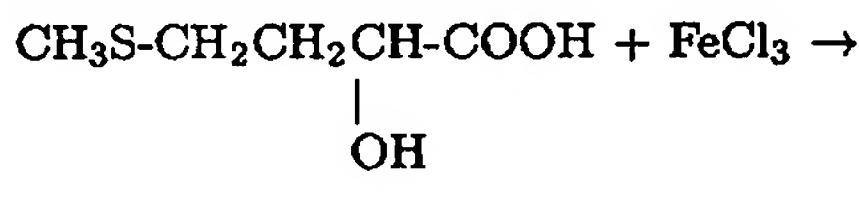


Ejemplo 3

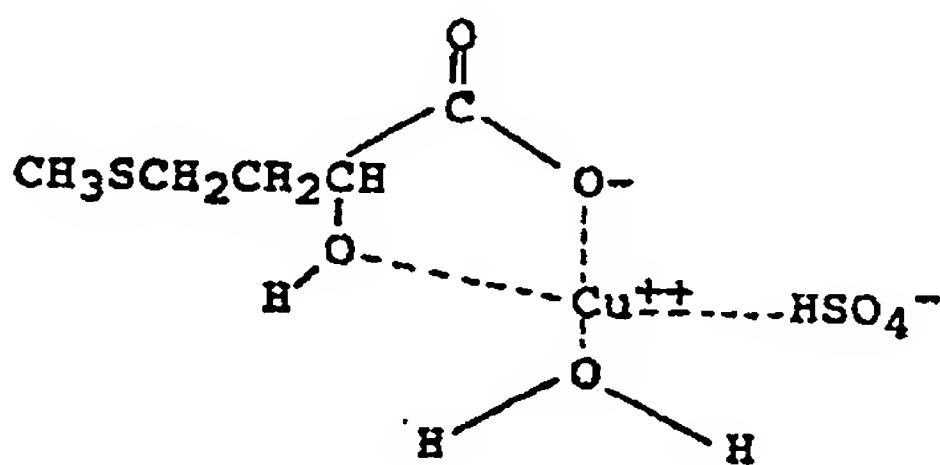
Cloruro del ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptopbutírico y hierro

Procedimiento 1

Un equivalente molar del ácido alfa-hidroxi, se añadió a una solución de un equivalente molar de cloruro férrico. La mezcla, se calentó con agitación simultánea para formar una solución de aspecto claro. La solución, se concentró bajo presión reducida. El producto de destilación, se recogió cuidadosamente y se valoró con una solución standard de hidróxido potásico utilizando fenolftaleína como indicador. Se recogió aproximadamente un 65 % de la cantidad teórica de ácido. El residuo de la sal mixta, se diluyó con agua y, la destilación, continuó proveyendo un 10 por ciento adicional del ácido.

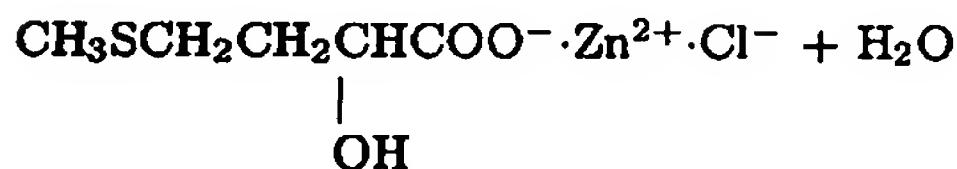
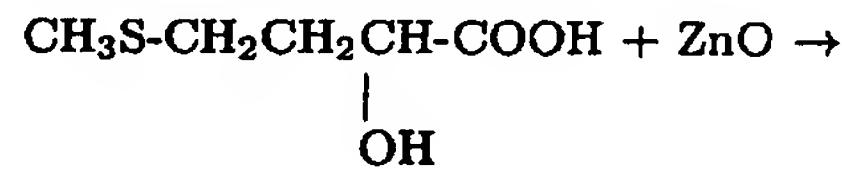


Las sales mixtas descritas en esta solicitud de patente, son formas más bioasquibiles del aminoácido de azufre y el oligoelemento o elemento de traza. Las sales son fácilmente solubles en agua y relativamente estables al valor pH de los contenidos de los intestinos de los animales. El catión del oligoelemento, se espera que esté presente en forma de un complejo con el alfa-hidroxiácido. Las valencias remanentes de la esfera de las coordenadas, estarán ocupadas con el anión contrario y agua, tal y como se muestra en la fórmula siguiente para el compuesto de cobre.



Ejemplo 4

Preparación del cloruro de zinc y de alfa-hidroxi-mercaptop-butirato



Se añadió óxido de zinc (8,14 g, 0,1 mol) a un vaso de precipitación que contenía agua destilada. Se añadió ácido clorhídrico concentrado (10 g, 0,1 mol) y se procedió a mezclar correctamente. Se añadió ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico (17,07 g de una solución al 88 %), 0,1 mol). La mezcla, se calentó hasta que ésta hirvió. Se obtuvo con ello una solución clara. Al ponerse en reposo, se empezó a formar un precipitado y se añadió ácido clorhídrico adicional (0,03 mol), con lo que se obtuvo una solución clara que era estable en reposo. La concentración de la solución, tenía un residuo oleaginoso que era fácilmente soluble en agua.

Ejemplo 5

Preparación de cloruro de alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico y cobre

Se añadió óxido de cobre (8,49 g, 0,1 mol) a una solución de ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico (17,07 g de un solución al 88 por ciento, 0,1 mol). La mezcla, se calentó y se añadió por goteo una solución de ácido clorhídrico 6 M. Después de que se hubieron añadido 17 ml (0,1 mol), se había disuelto la mayor parte del precipitado. Se añadieron 3 ml adicionales, para obtener con ello una solución de aspecto verde oscuro. Se procedió a filtrar la solución y únicamente quedaron trazas de óxido de cobre. El producto de la filtración se evaporó hasta secado, para proporcionar un residuo de aspecto resinoso.

El residuo era completamente soluble en agua y en metanol absoluto.

Procedimiento 2

Se añadieron 285 libras de sulfato de cobre pentahidratado ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) a 1000 libras de agua caliente (190 - 200°F). Después de que se hubiera disuelto todo el sulfato de cobre, se procedió a añadir lentamente 195 libras de una solución de ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico, mezclando y agitando continuamente al mismo tiempo. Después de un transcurso de tiempo de varios minutos, se había formado una solución de color verde oscuro. A la solución, se le añadieron 400 libras de un soporte soluble en agua (maltodextrina). Después de que se hubiese disuelto todo el soporte, la solución resultante se secó mediante proyección pulverizada, utilizando un secado sónico por impulsos. Se obtuvo con ello un polvo de color verde. Este polvo, se encontró que era muy soluble en agua. Los análisis de este producto, encontraron un 9 % de cobre.

Ejemplo 6

Preparación de cloruro de alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butirato férrico

Una solución de ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico (17,07 g de una solución al 88 por ciento, 0,1 mol) en agua (30 ml) se añadió a una solución de cloruro férrico (27,03 g de $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 0,1 mol) en agua (30 ml). La mezcla, se calentó mediante agitación simultánea, hasta que ésta obtuviese un aspecto claro. La mezcla, se concentró bajo presión reducida. El producto de destilación se recogió y se valoró con hidróxido potásico 0,1N, utilizando fenolftaleína como indicador. Se necesitaron 62 ml de hidróxido potásico 0,1N. El residuo, se diluyó con 100 ml de agua y se concentró adicionalmente bajo presión reducida. El producto de destilación, se valoró y se requirieron 7,2 ml de hidróxido potásico 0,1 N. El residuo de la sal férrica, en matraz de destilación, era de una tonalidad marrón oscuro rojizo, y era completamente soluble en agua.

Ejemplo 7

Preparación de cloruro mixto de alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butirato de manganeso y zinc

En un vaso de precipitación, se introdujo agua (50 ml) y se añadió cloruro de manganeso (9,90 g, 0,05 mol) y cloruro de zinc (6,82 g, 0,05 mol). La mezcla, se agitó y se calentó suavemente, para proporcionar una solución clara. A continuación, a la solución de cloruro de zinc y cloruro de manganeso, se le añadió por goteo una solución de ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico (17,07 g, 0,1 mol) en agua (50 ml). Se continuó con la agitación y con el calentamiento hasta que se obtuvo una solución de una tonalidad de clara. La solución se evaporó hasta el secado. El residuo, era completamente soluble en agua.

Basándose en los ejemplos anteriormente facilitados, se puede apreciar el hecho de que, los compuestos preparados en concordancia con el procedimiento correspondiente a la presente invención, tienen una mayor solubilidad en el agua en comparación con la de las sales de diácidos, de calcio y de zinc, de alfa-hidroxiácido, dadas anteriormente a conocer. De esta forma, estos compuestos, se espera que tengan una bioasquibilidad

superior como suplementos para comidas o pienso. Esta en camino un test de ensayo para ganado vacuno. Se ve por lo tanto que la invención

cumple por menos con todos sus objetivos establecidos.

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

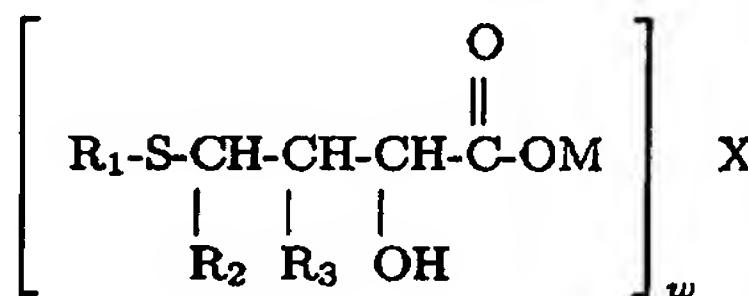
55

60

65

REIVINDICACIONES

1. Sales de ácidos alfa hidroxi-carboxílicos alifáticos, que tienen la fórmula general:



en donde,

R_1 , es metilo o etilo,

R_2 , es hidrógeno, metilo o etilo,

R_3 , es hidrógeno o metilo,

M , es un catión de un mineral oligoelemento, divalente o trivalente,

X es un anión y

W , es un número entero para equilibrar la carga aniónica de X .

2. Una sal, según se reivindica en la reivindicación 1, en donde, el catión, es un oligoelemento (elemento de traza) esencial.

3. Una sal, según se reivindica en la reivindicación 2, en donde, el catión, se selecciona de entre el grupo consistente en zinc, cobre, manganeso, hierro y cromo.

4. Una sal según se reivindica en la reivindicación 3, en donde, el catión, es el zinc.

5. Una sal según se reivindica en la reivindicación 3, en donde, el catión, es cúprico.

6. Una sal según se reivindica en la reivindicación 3, en donde, el catión, es ferroso o férrico.

7. Una sal según se reivindica en la reivindicación 3, en donde, el catión, es manganeso.

5 8. Una sal según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el anión, es un anión inorgánico.

9. Una sal según se reivindica en la reivindicación 8, en donde, el anión, es cloruro.

10 10. Una sal según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el anión, es un anión orgánico.

11. Una sal según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el catión, es un catión trivalente.

12. Una sal según se reivindica en las reivindicaciones 1 a 7, en donde, el catión, es un catión divalente.

15 13. Sales de ácidos alfa-hidroxi carboxílicos alifáticos, según se reivindica en la reivindicación 1, en donde:

20 X es un anión inorgánico seleccionado de entre el grupo consistente en haluros, sulfatos, y fosfatos;

25 M es un catión de mineral de traza divalente o trivalente; y

30 w es un entero, para equilibrar la carga aniónica de X .

35 14. Un procedimiento para preparar sales de ácidos alfa-hidroxi carboxílicos, alifáticos, que comprende:

la adición conjuntamente de un sal metálica a una cantidad equivalente de ácido alfa-hidroxi-gama-metil-mercaptop butírico, para proporcionar una mezcla de reacción, y calentar la citada mezcla de reacción a una temperatura mayor que la temperatura ambiente, pero que no exceda al punto de ebullición de la citada mezcla de reacción.

40 15. Un procedimiento según se reivindica en la reivindicación 14, en donde, la reacción, se conduce en presencia de agua.

45

50

55 60 65 **NOTA INFORMATIVA:** Conforme a la reserva del art. 167.2 del Convenio de Patentes Europeas (CPE) y a la Disposición Transitoria del RD 2424/1986, de 10 de octubre, relativo a la aplicación del Convenio de Patente Europea, las patentes europeas que designen a España y solicitadas antes del 7-10-1992, no producirán ningún efecto en España en la medida en que confieran protección a productos químicos y farmacéuticos como tales.

7 Esta información no prejuzga que la patente esté o no incluida en la mencionada reserva.

Utilización de metionina-zinc y metionina-manganoso en dietas del pollo de engorda: parámetros productivos e incidencia del síndrome ascítico

Use of zinc-methionine and manganese-methionine in broilers diets: productive parameters and ascites syndrome incidence

José Arce Menocal^a, Ernesto Avila González^b, Carlos López Coello^b, Fakler TM^c,
Christoph J. Rapp^c, Terry L. Ward^c, Guillermo Vela S.^c

RESUMEN

Se realizaron dos experimentos en pollos de engorda, con el objeto de evaluar el comportamiento productivo, mortalidad y susceptibilidad al síndrome ascítico (SA) a los 56 días de edad, con la adición en el alimento de metionina-zinc (MZn) y metionina-manganoso (MMn). En el primer ensayo se utilizaron 2,400 pollitos sexados, distribuyéndose con un arreglo factorial 2 x 3, siendo los factores el sexo y tratamientos, que consistieron en un testigo (uso de minerales inorgánicos); la sustitución parcial de Zn inorgánico por MZn (40 ppm) y MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm). En el segundo ensayo, se utilizaron 2,100 pollitos mixtos, distribuyéndose en tres tratamientos, los cuales consistieron en: un testigo, la sustitución parcial de Zn y Mn inorgánico por MZn (40 ppm) + MMn (50 ppm), así como MZn (20 ppm) + MMn (25 ppm). Los resultados no mostraron efectos significativos ($P>0.05$) en el peso corporal, consumo de alimento y conversión alimenticia. La adición conjunta de MZn + MMn disminuyó ($P<0.05$) la mortalidad general, 17.3, 15.1 y 12.2 % para el primer ensayo, y 21.1, 15.3 y 15.3 % para el segundo, así como para el SA, (11.4, 11.8 y 8.9 %) y (16.6, 9.9, 9.9 %) respectivamente. Los machos mostraron efectos ($P<0.01$) favorables en los parámetros productivos; las hembras ($P<0.01$), disminuyeron la mortalidad general y la registrada por el SA. Se concluye que el uso de MZn y MMn, ayuda a disminuir la mortalidad ocasionada por el SA.

PALABRAS CLAVE: Metionina-Zinc, Metionina-Manganoso, Pollo de engorda, Parámetros productivos, Síndrome ascítico.

ABSTRACT

In order to evaluate productive behavior, mortality rates and ascites syndrome susceptibility (AS) following addition of zinc-methionine (MZn) and manganese methionine (MMn), two experiments were carried out on 56 days old broilers. In the first, 2,400 sexed chicks were distributed in three treatments plus control in a randomized factorial 2 x 3 design. Factors assessed were gender, partial substitution of MZn (40 ppm) for inorganic zinc and MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm). The second assay consisted of 2,100 mixed sex chicks distributed in three treatments: control, partial substitution of MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm) for inorganic zinc and manganese and MZn (20 ppm) + MMn (25 ppm). Results did not show significant ($P>0.05$) effects on body weight, feed intake and feed conversion. The joint addition of MMn + MZn decreased ($P<0.05$) general mortality (17.3, 15.1 and 12.2 %) in the first assay, and also in the second one (21.1, 15.3 and 15.3 %) as well as mortality owing to AS (11.4, 11.8 and 8.9 %) (16.6, 9.9 and 9.9 %) for the first and second assays respectively. Males showed favorable effects ($P<0.01$) for productive parameters, females showed a decrease in general mortality ($P<0.01$) and for mortality owing to AS. It can be concluded that use of MZn and MMn can help decrease mortality owing to AS.

KEY WORDS: Zinc-methionine, Manganese-methionine, Broiler, Productive parameters, Ascites Syndrome.

Recibido el 25 de marzo de 2003 y aceptado para su publicación el 14 de julio de 2003.

a Campo Exp. Morelia, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Ecuador 120 Frac. Américas. 58270 Morelia, Michoacán, México. Tel (443) 3-15-27-72; jarce@unimedia.net mx. Correspondencia al primer autor.

b Departamento de Producción Animal: Aves. FMVZ-UNAM.

c Zinpro Corp. Animal Nutrition. MN, USA.

En los sistemas comerciales actuales, las estirpes avícolas están sometidas a situaciones de tensión, que son propias de las prácticas de explotación, lo que promueve una menor respuesta productiva, que varía en su magnitud, dependiendo de las agravantes o de la capacidad de adaptación. Para el nutriólogo, el poder contar con ingredientes de calidad en cuanto a su biodisponibilidad, sobre todo cuando las circunstancias demandan un aporte mayor, como ocurre durante los estados de tensión o enfermedad, es una garantía. La suplementación a las dietas con minerales traza (zinc y manganeso), de alta biodisponibilidad, conocidos también como complejos metal aminoácido específico (CMAE), de zinc (MZn) y de manganeso (MMn), los cuales se distinguen porque bajo un proceso, se unen a un aminoácido específico (en este caso a la metionina), han demostrado incrementar la respuesta inmune⁽¹⁾ y disminuir los efectos negativos en la producción de pavos^(1,2,3), reproductoras^(4,5) y gallinas productoras de huevo para plato^(6,7,8,9), en comparación con las formas inorgánicas de estos minerales.

Las experiencias realizadas en pollo de engorda, con la inclusión de MZn y MMn en dietas estándares, lograron tener una respuesta positiva sobre el comportamiento productivo, mejorando el rendimiento de la pechuga, disminuyendo el porcentaje de mortalidad así como, las lesiones en la piel y sistema digestivo⁽¹⁰⁾. Debido a la función que ejercen estos elementos, en las reacciones enzimáticas y en la oxidación celular, no se ha establecido, si bajo la forma descrita, pueden tener un efecto benéfico en el pollo de engorda criado en altitudes mayores de 1,500 msnm, sobre la mortalidad ocasionada por el síndrome ascítico (SA), dado el daño celular manifestado en aves que desarrollan el problema⁽¹¹⁾. Por ello, estudiar la respuesta productiva y la incidencia al SA, el cual sigue siendo una de las mayores causas de mortalidad⁽¹¹⁾ es motivo del presente estudio.

Se desarrollaron dos experimentos en una granja avícola experimental localizada en Morelia, Michoacán, México, a una altitud de 1,940 msnm con temperatura media anual de 17.7 °C. Para

In current commercial systems, chicken lineages are subject to diverse types of stress, due to common everyday production practices, which are the cause of losses of diverse magnitude in production owing to their lack of capacity to adapt themselves or to other aggravating circumstances. The nutritionist should therefore be able to count on high quality ingredients, regarding bioavailability, especially in those situations which demand a higher supply, such as illness or stress. Diet supplementation with trace elements (zinc and manganese) of high bioavailability, also known as specific amino acid metal compounds (AAMC), of Zinc (MZn) and Manganese (MMn) which bind themselves to a specific amino acid (methionine in this study) show a capacity to increase the immune response⁽¹⁾ and to diminish negative effects in turkey production^(1,2,3), breeder^(4,5) and laying hens^(6,7,8,9) in respect of these minerals inorganic formats.

Experiments carried out in broilers when MZn and MMn were added to standard diets showed positive responses for productive behavior, improving breast yields and diminishing the mortality rate and of injuries in skin and digestive tract⁽¹⁰⁾. Due to the function carried out by these elements, enzymatic reactions and cellular oxidation, no known positive effects on broilers bred at an altitude of more than 1,500 masl have been described on mortality owing to ascites syndrome, especially due to cellular injury present in birds who develop this disease⁽¹¹⁾. Because of this and to study a productive response and AS incidence, the present study was performed.

Two experiments were carried out in an experimental chicken farm in Morelia, Michoacán, México, at 1,940 masl altitude and with a 17.7 °C average annual temperature. Production and health management were the same in all replications. Chicks were vaccinated against Marek disease in the incubator and three vaccines were applied to them in the farm, two against Newcastle (ocularly and orally) at 8 and 25 d of age and one against Gumboro at 14 d of age. Birds were placed in concrete floor pens, at a 10 birds/m² density and provided with natural lighting (11 h/d average).

ambos trabajos el programa de manejo y el sanitario fueron similares para todas las réplicas; en la planta incubadora se aplicó la vacuna contra Marek y en la granja experimental se aplicaron tres vacunas; dos contra la enfermedad de Newcastle por vía ocular y oral (cepa La Sota) a los 8 y 25 días de edad, y una contra la enfermedad de Gumboro a los 14 días de edad. Las aves fueron alojadas en piso de cemento, con una densidad de población de 10 aves/m², con un programa de iluminación de luz natural, obteniéndose un promedio de 11 horas diarias de luz. Las dietas fueron a base de sorgo + soya, con una presentación en forma de migaja, y cubrían por cálculo las recomendaciones del NRC,(12) excepto energía metabolizable (Cuadro 1).

Experimento 1

Se utilizaron 2,400 pollitos sexados en la incubadora, de un día de edad, los cuales se mantuvieron en producción hasta los 56 días de edad. Se distribuyeron mediante un diseño completamente al azar, con un arreglo factorial 2 x 3 con cuatro réplicas de 100 aves cada uno, siendo los factores el sexo y los tratamientos, los cuales consistieron en un testigo con la adición de minerales inorgánicos, y la sustitución parcial de estos a la dieta con MZn y MMn (Cuadro 2).

Experimento 2

Se utilizaron 2,100 pollitos mixtos de un día de edad, los cuales se mantuvieron en producción hasta los 56 días de edad. Se distribuyeron mediante un diseño completamente al azar, en tres tratamientos con siete réplicas de 100 aves cada uno. Los tratamientos consistieron en un testigo con la adición de minerales inorgánicos y la sustitución parcial a la dieta de MZn y MMn (Cuadro 2).

Para ambos experimentos, los criterios de respuesta evaluados fueron el peso corporal, consumo de alimento, conversión de alimento y mortalidad general, hasta los 56 días de edad. A las aves muertas se les realizó la necropsia para determinar aquéllas que murieron a causa del síndrome ascítico.

Los datos obtenidos de cada una de las variables descritas, fueron estudiados a través de un análisis

Cuadro 1. Análisis calculado de las dietas utilizadas en los experimentos con pollos de engorda (%)

Table 1. Calculated analyses of diets used in experiments with broilers (%)

Nutrients	Age (days)		
	1-21	22-35	36-56
Protein	23.0	20.0	18.0
ME, Kcal/kg	3.00	3.05	3.15
Lysine	1.10	1.00	0.85
Methionine	0.50	0.38	0.32
Methionine + cystine	0.90	0.72	0.60
Tryptophane	0.20	0.19	0.16
Threonine	0.80	0.74	0.68
Phosphorous (available)	0.45	0.35	0.30
Calcium	1.00	0.90	0.80
Sodium	0.21	0.19	0.19
Iron	110	110	110
Zinc	100	100	100
Manganese	110	110	110
Copper	12	12	12
Iodine	0.300	0.300	0.300
Cobalt	0.200	0.200	0.200
Selenium	0.100	0.100	0.100

ME= metabolizable energy

Diets were based on sorghum + soybeans as crumbs and covered NRC(12) recommendations through calculation, except for metabolizable energy (Table 1).

Experiment 1

A total of 2,400 1-d-old sexed chickens were kept in production for 56 d and distributed in a completely randomized 2 x 3 factorial arrangement with four replications of 100 birds each, being the factors analyzed sex and treatments consisting of control, partial substitution of MZn and MMn for inorganic zinc and manganese and partial substitution of MZn and MMn (Table 2).

Experiment 2

A total of 2,100 1-d-old chickens were kept in production for 56 d and distributed in a completely randomized arrangement with seven replications of

Cuadro 2. Tratamientos establecidos en ambos experimentos (ppm)

Table 2. Treatments for both experiments (ppm)

Tratamientos	MMn (Manpro)*	MZn (Zinpro)*	Mn (inorganic) (commercial)	Zn (inorganic) (commercial)	Mn Total	Zn Total
Experiment 1						
Control	0	0	110	100	110	100
MZn	0	40	110	60	110	100
MZn + MMn	40	40	70	60	110	100
Experiment 2						
Control	0	0	110	100	110	100
MMn + MZn	50	40	60	60	110	100
MMn + MZn	25	20	85	80	110	100

MMn = methionine-manganese; Mzn = methionine-zinc.

*Zinpro®

de varianza, y cuando hubo diferencia significativa, se realizó la comparación por la prueba de Tukey⁽¹³⁾. Los porcentajes de mortalidad para su análisis, fueron transformados con la función arco seno raíz cuadrada de la proporción.

No existieron diferencias significativas entre el testigo y la sustitución parcial de MZn y MMn para peso corporal (2,735, 2,818 y 2,809 g), consumo de alimento (5,763, 5,676 y 5,664 g) y conversión alimenticia (2.13, 2.03 y 2.04 g/g); mostrando diferencia ($P < 0.05$) la mortalidad general (17.3, 15.1 y 12.2 %) y la registrada por el síndrome ascítico (11.4, 11.8 y 8.9 %), a favor de la adición conjunta de los CMAE de MMn + MZn (Cuadro 3). Los machos presentaron mayor peso corporal (3,138 vs 2,436 g), consumo de alimento (5,975 vs 5,428 g), mortalidad general (16.8 vs 12.9 %) y síndrome ascítico (12.8 vs 8.6 %), con una mejor conversión de alimento (1.91 vs 2.23 g/g) en relación a las hembras, sin mostrar efectos de interacción entre los parámetros evaluados.

Los resultados finales de los parámetros productivos se muestran en el Cuadro 4, no encontrando diferencias ($P > 0.05$) en el peso corporal (2,802, 2,762 y 2,794 g), consumo de alimento (5,884, 5,873 y 5,892 g) y conversión de alimento (2.12,

100 birds each. Treatments being control, partial substitution in the diet of MZn (40 ppm) + MMn (40 ppm) for inorganic zinc and manganese and addition of MZn + MMn to the diet (Table 2).

In both experiments, assessed response criteria were body weight, feed intake, feed conversion and general mortality up to 56 d of age. A necropsy was carried out in dead animals to determine AS.

Data obtained for each of the already described variables, were subjected to a variance analysis and when differences were significant, to Tukey's test⁽¹³⁾. Mortality rates to be analyzed, were transformed through the arc sine function of the proportionate square root.

No significant differences were found between control and partial substitution of MZn and MMn for body weight (2.735, 2.818 and 2.809 kg), feed intake (5.763, 5.676 and 5.664 kg) and feed conversion (2.13, 2.03 and 2.04 g/g). General mortality (17.3, 15.12 and 12.2 %) showed differences ($P < 0.05$), and mortality owing to ascites syndrome (11.4, 11.8 and 8.9 %) also for the joint addition of AAMCs, MZn + MMn (Table 3). Males presented higher body weight (3,138 vs 2,436 g), feed intake (5,975 vs 5,428 g), overall mortality (16.8 vs 12.9 %), mortality owing

COMPLEJOS METAL AMINOÁCIDO ESPECÍFICO

2.15 y 2.12 g/g) entre los tratamientos evaluados. El lote testigo presentó mayor ($P < 0.05$) mortalidad general (21.1, 15.3 y 15.3 %) y por síndrome ascítico (16.6, 9.9 y 9.9 %) con relación a los tratamientos en donde se adicionaron los CMAE.

La sustitución parcial de la adición conjunta en las dietas de MZn y MMn, disminuyeron la mortalidad total y la presentada por el síndrome ascítico, sin modificar los parámetros productivos, en ambos experimentos. Los resultados obtenidos entre

to ascites syndrome (12.8 vs 8.6 %), and feed conversion (1.91 vs 2.23 g/g), than females, not showing any interactions between the parameters being assessed.

Final results of productive parameters are shown in Table 4. No significant differences ($P > 0.05$) were found for body weight (2,802, 2,762 and 2,794 g), feed intake (5,884, 5,873 and 5,892 g) and feed conversion (2.12, 2.15 and 2.12 g/g) between treatments. Control showed the greater

Cuadro 3. Parámetros productivos obtenidos a los 56 días de edad en el pollo de engorda con adición en el alimento de CMAE (Exp 1)*

Table 3. Productive parameters obtained at 56 days of age in broilers when AAMC was added to their feed (Exp 1)*

	Body weight (g)	Feed intake (g)	Feed conversion (g/g)	Mortality (%)	
				General	Ascites
Treatments:					
Control	2735 ± 75 a	5763 ± 106 a	2.13 ± 0.06 a	17.3 ± 3 a	11.4 ± 3 b
MZn	2818 ± 70 a	5676 ± 125 a	2.03 ± 0.05 a	15.1 ± 3 ab	11.8 ± 3 a
MMn+MZn	2809 ± 79 a	5664 ± 138 a	2.04 ± 0.06 a	12.2 ± 3 b	8.9 ± 2 b
Sex:					
Male	3138 ± 98 c	5975 ± 126 d	1.91 ± 0.05 c	16.8 ± 3 d	12.8 ± 3 d
Female	2436 ± 88 d	5428 ± 138 c	2.23 ± 0.06 d	12.9 ± 2 c	8.6 ± 2 c

* Mean ± SD

AAMC = specific amino acid metal compound; MZn = methionine-zinc; MMn = methionine-manganese.

ab Values with different literals within treatments in columns show significant differences ($P < 0.05$).

cd Values with different literals within sexes in columns show significant differences ($P < 0.01$).

Cuadro 4. Parámetros productivos obtenidos a los 56 días de edad en el pollo de engorda con adición en el alimento de CMAE (Exp 2)*

Table 4. Productive parameters obtained at 56 days of age in broilers when AAMC was added to their feed (Exp 2)*

	Body weight (g)	Feed intake (g)	Feed conversion (g/g)	Mortality (%)	
				General	Ascites
Control	2802 ± 45 a	5884 ± 99 a	2.12 ± 0.03 a	21.1 ± 4 b	16.6 ± 4 b
MMn+MZn 50/40	2762 ± 52 a	5873 ± 102 a	2.15 ± 0.04 a	15.3 ± 4 a	9.9 ± 4 a
MMn+MZn 25/20	2794 ± 49 a	5892 ± 115 a	2.13 ± 0.05 a	15.3 ± 5 a	9.9 ± 4 a

* Mean ± SD

AAMC = Specific amino acid metal compound.

ab Values with different literals within columns show significant differences ($P < 0.05$).

sexos, fueron los esperados en crianzas realizadas a mayores altitudes⁽¹⁴⁾, donde los machos presentaron mayores pesos, mayores consumos de alimento, así como una elevada mortalidad general debido al síndrome ascítico, manifestando una mejor conversión alimenticia, con relación a las hembras. Si bien es cierto, que en estos trabajos no se demostró un efecto positivo sobre los parámetros de producción, como lo encontrado por Schugel⁽¹⁰⁾, sí se manifestó una reducción en la mortalidad general, principalmente debido a la disminución del síndrome ascítico (llamado últimamente síndrome de la hipertensión pulmonar)⁽¹⁵⁾, el cual es acompañado de un estrés oxidativo de las células, en donde la mitocondria contribuye en forma importante, debido a la gran demanda que tiene en la producción de energía para sostener la velocidad de crecimiento en el pollo de engorda, y al potencial para mantener activos los niveles de oxígeno celular⁽¹⁶⁾. En aves con hipertensión pulmonar se observa una deteriorada función de fosforilación-oxidativa de la mitocondria, lo que conlleva a una menor eficiencia del oxígeno⁽¹⁷⁾, por lo que se podría explicar el efecto benéfico que tienen los CMAE de MZn y MMn, en la disminución del síndrome ascítico, por un lado, como elementos quelantes son transportados en su totalidad hasta las células, y por el otro, al ser más disponibles, cumplen su misión de mantener la integración a nivel celular, lo que puede prevenir la formación de peróxidos hidrogenados, los cuales oxidan componentes celulares críticos tales como el DNA, proteínas y membranas^(18,19), evitando la disminución de oxigenación requerida para los procesos de crecimiento y mantenimiento, y la posterior presentación del síndrome ascítico en el pollo de engorda.

Se concluye que la adición conjunta en el alimento de CMAE de MZn y MMn en el pollo de engorda criado en mayores altitudes, no modifican la respuesta productiva, con relación al uso de estos minerales en forma inorgánica, sin embargo, disminuyeron la mortalidad general y la ocasionada por el síndrome ascítico, debido a una mayor biodisponibilidad dentro del organismo.

overall mortality (21.1, 15.3 and 15.3 %) and that owing to ascites syndrome (16.6, 9.9 and 9.9 %) relative to those treatments in which it was added to diverse CMAE levels.

Partial substitution of the addition of MZn and MMn to diets diminished both, general and AS mortality without modification of productive parameters in both experiments. Results obtained between sexes were in accordance with what was to be expected when breeding at high altitudes⁽¹⁴⁾, males showing higher weight, higher feed intake and conversion and also high mortality owing to AS when compared to females. Although this study did not show positive effects on productive parameters as those found by Schugel⁽¹⁰⁾, a reduction in general mortality, mainly due to a lower AS (also known as lung hypertension syndrome)⁽¹⁵⁾ incidence, was evident. This is usually associated with a cell oxidation stress, in which mitochondria contribute clearly, owing to a high demand due to energy production for growth and to a potential to maintain active the cellular oxygen levels⁽¹⁶⁾. In birds showing lung hypertension a damaged oxidative phosphorylation function in mitochondria can be observed, which results in a lower oxygen efficiency⁽¹⁷⁾, which could help explain the beneficial effect of MZn and MMn AAMC on SA decrease on the one hand as chelation elements transported to cells and on the other hand, of accomplishing their mission of maintaining integration at the cellular level, which could prevent hydrogen peroxide formation that oxidize critical cellular components as DNA, proteins and membranes^(18,19), thus preventing a decrease of the oxygenization required in growth and maintenance processes and a subsequent incidence of AS in broilers.

As a conclusion, the joint supplementation of MZn and MMn AAMC to broilers diets bred at high altitudes do not modify their productive response relative to those elements being provided in their inorganic form. However, general and AS mortality showed a decrease owing to a higher bioavailability inside the body.

End of english version

COMPLEJOS METAL AMINOÁCIDO ESPECÍFICO

LITERATURA CITADA

1. Kidd MT, Qureshi MA, Ferket PR, Thomas LN. Blood clearance of *Escherichia coli* and evaluation of mononuclear-phagocytic system as influenced by supplemental dietary zinc-methionine in young turkeys. *Poultry Sci* 1994;73:1381-1389.
2. Ferket PR, Qureshi MA. Effect of level of inorganic and organic zinc and manganese on the immune function of turkey toms [abstract]. *Poultry Sci* 1992;71(Suppl 1):60.
3. Ferket PR, Nicholson L, Roberson KD, Yoong CK. Effect of level of inorganic and organic zinc and manganese on the performance and leg abnormalities of turkey toms. *Nutr* 1992;17:141-150.
4. Kidd MT, Anthony NB, Newberry LA, Lee SR. Effect of supplemental zinc in either a corn-soybean or a milo and corn-soybean meal diet on the performance of young broiler breeders and their progeny. *Poultry Sci* 1993;72:1492-1499.
5. Kidd MT, Anthony NB, Johnson ZB, Lee SR. Effect of zinc methionine supplementation on the performance of mature broiler breeders. *J Appl Poult Res* 1992;1:207-211.
6. Flinchum JD, Nockels CF, Moreng RE. Aged hens fed zinc-methionine had chicks with improved performance [abstract]. *Poultry Sci* 1989;68(Suppl 1):55.
7. Moreng RE, Balnave D, Zhang D. Dietary zinc methionine effect on eggshell quality of hens drinking saline water. *Poultry Sci* 1992;71:1163-1167.
8. Harbaugh DD, Sanford PE. The effect of various levels of zinc-methionine supplement on flock performance, egg size and shell quality [abstract]. *Poultry Sci* 1970;49:1393.
9. Kienholz EW, Moreng RE, Flinchum JD. Zinc methionine for stressed laying hens. *Poultry Sci* 1992;71:829-832.
10. Schugel LM. Summary of 13 broiler studies feeding zinc methionine and manganese methionine. Internal report. Zinpro Corporation, Eden Prairie, USA. 1996.
11. Maxwell MH, Robertson CW. Cardiovascular disease in poultry: Epidemiology-current trends and correlates. International poultry congress. Montreal, Canada. 2000:1-10.
12. NRC. National Research Council. The nutrient requirements of poultry. 8th rev. ed. Washington, DC, USA: National Academy Press; 1994.
13. Steel RGD, Torrie JH. Principles and procedures of statistics: A biometrical approach. 2nd ed. New York, USA: McGraw-Hill Book Co.; 1980.
14. López CC, Arce MJ, Avila GE, Vásquez PC. Investigaciones sobre el síndrome ascítico en pollos de engorda. *Ciencia Veterinaria* 1991;5:13-48.
15. Roush WB, Wideman RF. Evaluation of broiler growth velocity and acceleration in relation to pulmonary hypertension syndrome. *Poultry Sci* 2000;78:180-191.
16. Maxwell MH, Robertson CW, Farquharson C. Evidencie of ultracytochemical mitochondria-derived hydrogen peroxide activity in myocardial cells from broiler chickens with an ascites syndrome. *Rev Vet Sci* 1996;61:7-12.
17. Estabrook RW. Mitochondrial respiratory control and the polarographic measurement of ADP:O ratios. *Methods Enzymol* 1967;10:41-47.
18. Prasad AS. Nutritional metabolic role of zinc. *Federation Proc* 1967;26:172.
19. Leach RM. Effect of manganese upon the epiphyseal growth plate in the young chick. *Poultry Sci* 1968;47:828.